

# **CONSENSO CIENTÍFICO SOBRE PREBIÓTICOS**

**N. Corzo,<sup>1\*</sup> J. L. Alonso<sup>2</sup>, F. Azpiroz<sup>3</sup>, M. A. Calvo<sup>4</sup>, M. Cirici<sup>5</sup>, R. Leis<sup>6</sup>, F. Lombó<sup>7</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>8</sup>, F. J. Plou<sup>9</sup>, P. Ruas-Madiedo<sup>10</sup>, P. Rúperez<sup>11</sup>, A. Redondo-Cuenca<sup>12</sup>, M. L. Sanz<sup>13</sup>, A. Clemente<sup>14</sup>**

*Octubre 2014*

<sup>1</sup> Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM) Madrid, España. <sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Vigo. Facultad de Ciencias. Campus de Ourense. Ourense. España. <sup>3</sup> Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España. <sup>4</sup> Grupo de investigación en Microbiología aplicada y medio-ambiental. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Campus de Bellaterra. Barcelona. España. <sup>5</sup> BENE.O.Connecting nutrition and health. BENE.O-Ibérica Barcelona, España. <sup>6</sup> Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica-Dpto. Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Santiago-Área de Gestión Integrada de Santiago. Universidad de Santiago de Compostela, España. <sup>7</sup> Grupo de Investigación de Biotecnología y Terapia Experimental basada en Nutraceuticos (BITTEN). Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Facultad de Medicina, Oviedo, España. <sup>8</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. <sup>9</sup> Grupo de Biocatálisis Aplicada, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC. Madrid, España. <sup>10</sup> Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias – (IPLA-CSIC) Asturias, España. <sup>11</sup> Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) Madrid, España. <sup>12</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España. <sup>13</sup> Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental. Instituto de Química Orgánica General (CSIC), Madrid, España. <sup>14</sup> Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Granada, España.

## **¿QUÉ SON LOS PREBIÓTICOS? SE HAN PROPUESTO DIFERENTES DEFINICIONES, SIN EMBARGO, ACTUALMENTE SE DEBATE SI ÉSTAS REFLEJAN TODAS LAS PROPIEDADES QUE PUEDEN PRESENTAR**

Los primeros estudios sobre prebióticos se remontan a los años 80 cuando investigadores japoneses demostraron en cultivos *in vitro* utilizando como inóculo heces humanas, que ciertos oligosacáridos no digeribles (fundamentalmente fructooligosacáridos o FOS) eran fermentados selectivamente por bifidobacterias y que además tenían la capacidad de estimular su crecimiento. Los resultados de estos trabajos fueron confirmados por Gibson y Roberfroid <sup>1</sup> quienes definieron por primera vez un prebiótico como *“un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud”*. En 2010, Roberfroid y col <sup>2</sup> revisaron de nuevo este concepto e indicaron que los prebióticos son *“ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador”*. Estos investigadores consideran que el efecto prebiótico debe usarse para identificar o indicar cambios selectivos en la microbiota intestinal además de efectos fisiológicos cuando se realizan estudios de intervención en humanos o experimentales.

Diferentes organismos internacionales tales como la Food and Agriculture Organization (FAO) <sup>3</sup> de Naciones Unidas y la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) <sup>4</sup> también definieron a los prebióticos como: *“ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”*. Asimismo, la World Gastroenterology Organisation (WGO) <sup>5</sup> definió a los prebióticos como: *“sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”*.

## PROPIEDADES QUE DEBEN PRESENTAR LOS COMPUESTOS PREBIÓTICOS

Para que un ingrediente alimentario o un alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: i) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal (TGI) superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; ii) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y iii) ser capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud <sup>1</sup>.

De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser considerados como prebióticos. Estos carbohidratos pueden estar presentes de forma natural en alimentos tales como leche, miel, hortalizas y verduras (puerro, alcachofa, espárragos, ajo, cebolla, achicoria...), frutas, cereales (trigo, avena), legumbres y frutos secos de donde se pueden extraer, aunque también pueden obtenerse por métodos químicos y enzimáticos<sup>6</sup>.

Los carbohidratos no digeribles se clasifican en dos grupos, *colónicos (fibra alimentaria)* y *prebióticos*. Los ingredientes *colónicos* son carbohidratos que llegan al colon, sirven como sustrato para los microorganismos que lo habitan originando energía, sustratos metabólicos y micronutrientes esenciales para el hospedador. Dentro de este grupo se incluyen los polisacáridos estructurales de plantas, tales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, gomas o algunos oligosacáridos derivados de la soja, glucooligosacáridos, arabinoooligosacáridos, etc. Los *prebióticos* realizan todas las actividades mencionadas anteriormente, pero además, estimulan el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas de la microbiota intestinal, principalmente bifidobacterias y lactobacilos <sup>1</sup>.

## **EXISTEN EVIDENCIAS CIENTIFICAS PARA CONSIDERAR A CIERTOS CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES COMO PREBIÓTICOS**

Aunque en el mercado mundial se están comercializando como prebióticos un gran número de carbohidratos, solamente existe evidencia científica de sus propiedades en humanos en los fructanos (tipo inulina y los FOS), los galactooligosacáridos (GOS), la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (HMO) <sup>7-9</sup>. La inulina está formada por oligosacáridos y polisacáridos en los que el grado de polimerización (DP) varía de 2 a 65 unidades con un valor medio de 10. Los FOS son oligosacáridos con un DP de 2 a 7 y se obtienen por hidrólisis de la inulina presente en productos vegetales o mediante transfructosilación enzimática, a partir de sacarosa, utilizando fructosiltransferasas. La lactulosa es un disacárido sintético y es el prebiótico más sencillo. Es resistente a las enzimas digestivas de tal forma que no es hidrolizada alcanzando el colon inalterada y allí es metabolizada selectivamente por las bifidobacterias y lactobacilos. Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de la lactosa del permeado de suero de quesería, mediante transglicosilación catalizada por  $\beta$ -galactosidasas (lactasas). Los GOS también se encuentran de forma natural en la leche humana y animal. Estos oligosacáridos contienen de 2-10 moléculas de galactosa unidas a una glucosa terminal y se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en el tipo de enlace <sup>10</sup>. La leche humana contiene hasta un 10% de carbohidratos de los cuales la lactosa es el mayoritario (55-70 g/L), encontrándose los HMO en concentraciones comprendidas entre 12-14 g/L, y mayores niveles en el calostro (22-24 g/L). A estos oligosacáridos se les considera como los primeros prebióticos en la alimentación humana, ya que se ha comprobado que son los responsables del alto número de bifidobacterias presentes en heces de lactantes y también se les conoce como factor bifidogénico <sup>11-13</sup>.

Por otra parte, el creciente interés por buscar y comercializar nuevos oligosacáridos prebióticos con propiedades funcionales mejoradas ha hecho que en el mercado actual existan carbohidratos considerados como prebióticos pero de los que no existen suficientes evidencias científicas, tales como xilooligosacáridos (XOS), lactosacarosa (LS), isomaltooligosacáridos (IMOS), oligosacáridos de soja y glucooligosacáridos. Otros carbohidratos no digeribles tales como pectooligosacáridos (POS), polidextrosa (PDX), exopolisacáridos bacterianos (EPS) y los polisacáridos de macroalgas están en las fases iniciales de estudio <sup>9</sup>.

## **LA DEMOSTRACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO DE UN CARBOHIDRATO NO DIGERIBLE IMPLICA EL CONOCIMIENTO PREVIO DE SU ESTRUCTURA**

La estructura de los carbohidratos prebióticos, es decir la composición en monosacáridos, el tipo de enlace glicosídico y el peso molecular, ejercen una gran influencia en las propiedades que estos pueden presentar. En general, cuando se lleva a cabo la extracción de fuentes naturales o la síntesis enzimática de prebióticos se obtienen mezclas complejas de carbohidratos con diferentes grados de polimerización, e incluso isómeros, dificultando enormemente la caracterización de los mismos. En la hoja de ruta que establece la FAO<sup>3</sup> para la evaluación y comprobación de los prebióticos para su utilización en alimentos indica que, para establecer las propiedades de estos, en primer lugar deben de estar caracterizados adecuadamente. Además de conocer la estructura, establecen parámetros importantes a considerar tales como la procedencia (origen y fuente de obtención), la pureza y la composición química del prebiótico. Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas analíticas adecuadas que permitan aislar, identificar y caracterizar los carbohidratos prebióticos facilitando de esta forma el estudio que permita relacionar la influencia de la estructura en la función de los mismos<sup>14</sup>.

## **PARA EVIDENCIAR CIENTIFICAMENTE EL CARÁCTER PREBIÓTICO DE UN CARBOHIDRATO NO DIGERIBLE SON IMPRESCINDIBLES LOS ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* CON ANIMALES**

Otra de las fases que indica la FAO<sup>3</sup> en su documento es la caracterización funcional del prebiótico mediante la utilización de diferentes modelos. Se han desarrollado una serie de modelos (*in vitro* e *in vivo*) para estudiar la resistencia de los candidatos a prebióticos a la digestión y absorción, al menos parcial, en el tracto gastrointestinal superior<sup>15</sup>.

Para llevar a cabo el estudio de la capacidad de los prebióticos para modular la composición de la microbiota intestinal y/o la producción de compuestos beneficiosos para la salud, como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), también se utilizan

diferentes modelos de fermentación *in vitro* e *in vivo*. El modelo de fermentación *in vitro* más simple consiste en evaluar el comportamiento, como inóculo, de cultivos puros, generalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en presencia del sustrato. Actualmente, se tiende a analizar la evolución de la microbiota intestinal en su conjunto empleando, principalmente, homogenizados de origen fecal de individuos donantes sanos. Se utilizan biorreactores para realizar cultivos en discontinuo (*batch*), o para cultivos en continuo que pueden ser simples o múltiples. Entre los sistemas múltiples, es frecuente la utilización de modelos de fermentación continuos o dinámicos (*gut model*) que constan de diversas vasijas para simular las condiciones de las distintas partes del colon. Los nuevos modelos que se están desarrollando intentan incluir componentes del hospedador, como mucus o mucinas, así como líneas celulares de colon (Caco2, HT29, etc.), para estudiar la posible interacción entre prebiótico, microbiota y hospedador <sup>16-18</sup>.

En los modelos de fermentación *in vivo* se utilizan animales de experimentación para confirmar el efecto de los prebióticos sobre la dinámica y actividad de la microbiota intestinal y también para estudiar posibles mecanismos de acción <sup>15</sup>. Con estos objetivos, el modelo animal más empleado es el de roedor (ratón y rata), aunque también hay estudios con animales domésticos y de granja para validar potenciales prebióticos para su utilización en alimentación animal. Se pueden emplear animales libres de microorganismos (*germ-free animals*) que se colonizan con microbiota humana (*gnotobiotic animals*), permitiendo de este modo estudiar *in vivo* el efecto de potenciales prebióticos sobre microbiota humana. Para estudiar los efectos relacionados con la ingesta de determinados prebióticos sobre ciertas disfunciones fisiológicas o enfermedades, se emplean modelos animales específicos modificados genéticamente o inducidos para simular, por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales, cáncer de colon, síndrome metabólico, diabetes, u osteoporosis, entre otras <sup>19</sup>.

## **PARA EVIDENCIAR CIENTIFICAMENTE EL CARÁCTER PREBIÓTICO DE UN CARBOHIDRATO NO DIGERIBLE SON IMPRESCINDIBLES LOS ENSAYOS DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS**

Para finalizar con la hoja de ruta que permite demostrar científicamente la eficacia de los prebióticos, es necesario llevar a cabo estudios estándar de evaluación clínica de fase 2 (demostración de eficacia) en humanos. En primer lugar, hay que definir el resultado

(*outcome*) principal (y secundarios, si hubiera) que se espera conseguir con el estudio de intervención con el prebiótico. También hay que definir el tamaño de muestra (población) necesario para demostrar con significación estadística el resultado(s) que se espera obtener y hay que proponer los parámetros fisiológicos a medir para demostrar el efecto. El diseño experimental del estudio de intervención debe ser doble-ciego, aleatorizado y controlado con placebo <sup>3, 20-21</sup>.

## **EXISTEN EVIDENCIAS CIENTIFICAS DE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PREBIÓTICOS**

Algunos estudios sugieren que los prebióticos pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y el bienestar del hospedador en relación fundamentalmente con su capacidad de modular la microbiota intestinal. La disbiosis parece estar implicada en muchas de las patologías que son hoy las principales causas de morbilidad y muerte en el mundo occidental, por lo que los prebióticos podrían contribuir no sólo a reducir el riesgo de padecer diversas enfermedades intestinales, sino también sistémicas. Entre los efectos producidos en el colon, cabe mencionar, que los prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias fermentativas (bifidobacterias y lactobacilos) con efectos beneficiosos para la salud. Generan SCFA que producen un descenso del pH controlando el desarrollo de ciertas comunidades de la microbiota que puede tener efectos perjudiciales (p. ej. algunas especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium*) <sup>6, 22</sup>.

Existen datos que apoyan el hecho de que la ingesta de prebióticos podría reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades como el síndrome de colon irritable (Irritable bowel syndrome, IBS), enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory bowel disease, IBD) y de enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la pouchitis. Además, estudios recientes han descrito diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes con síntomas digestivos funcionales y sujetos sanos, si bien los resultados no son totalmente concordantes. Por tanto son necesarios más estudios para determinar el papel de los prebióticos en la fisiopatología y tratamiento de la patología intestinal crónica.

Los prebióticos pueden tener también un efecto protector frente a infecciones intestinales, diarreas del viajero o producidas por tratamiento con antibióticos, probablemente debido a las propiedades antiadherentes que presentan. Esto puede ser

debido al bloqueo de los lugares donde se adhieren los microorganismos patógenos o sus toxinas en las células epiteliales y actuando, por lo tanto, como análogos de los receptores del epitelio intestinal <sup>7</sup> y/o a que muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias, que ven favorecido su crecimiento por el uso de prebióticos, pueden producir agentes antimicrobianos (SCFA y péptidos) de amplio espectro de acción.

Por otra parte, también se ha observado que los carbohidratos prebióticos favorecen la absorción de minerales (calcio, magnesio, zinc y hierro), reducen la presión arterial, y los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en sangre, así como la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado previniendo, de este modo, el riesgo de padecer diabetes, obesidad y de desarrollar aterosclerosis <sup>23-24</sup>. Los cambios producidos en el metabolismo lipídico pueden ser una consecuencia de la producción de SCFA, que pueden inducir cambios metabólicos en el hígado.

Además, los prebióticos y concretamente la lactulosa, también se utilizan en el tratamiento de la encefalopatía portal sistémica, enfermedad que afecta al sistema nervioso central por la elevación del contenido de amonio en sangre. Los prebióticos restablecen la microbiota beneficiosa y frenan el crecimiento de bacterias productoras de amonio. En el caso de pacientes con cirrosis se han utilizado XOS <sup>25</sup> y lactulosa <sup>26</sup> para controlar los niveles de amonio y fenoles libres en sangre.

## **ES NECESARIO ESTABLECER LA INGESTA ADECUADA DEL PREBIÓTICO PARA QUE EJERZA LOS EFECTOS BENEFICIOSOS**

Aunque se han demostrado un gran número de efectos beneficiosos de los prebióticos, hay que tener en cuenta un factor muy importante para evitar efectos adversos, esto es, establecer la ingesta adecuada de estos carbohidratos, ya que si esta es excesiva, podría provocar molestias intestinales, diarrea y flatulencia. Se ha demostrado que una ingesta por encima de 20g/día de GOS podría provocar diarrea <sup>27</sup>. Para establecer la ingesta adecuada, hay que considerar una serie de factores entre los que se incluyen el tipo de oligosacárido, aunque la mayor parte de estos carbohidratos pueden incrementar la población de bifidobacterias cuando se consumen 15g/día <sup>28</sup>. Por otra parte, también habría que tener en cuenta la microbiota de cada individuo. Roberfroid <sup>29</sup>, estableció que una ingesta diaria de prebióticos no es tan determinante en el efecto bifidogénico, sino que está directamente relacionada con el número de bifidobacterias presentes en el hospedador antes de empezar la suplementación en la dieta con el prebiótico. Hay



estudios que han demostrado que una ingesta de 10g/día de GOS, en individuos sanos y de edad media, sería suficiente para ejercer el efecto bifidogénico. Sin embargo, si el número de bifidobacterias de partida es bajo, como podría ser el caso de personas de edad avanzada, la ingesta de 2,5 g/día sería suficiente para producir un aumento en la población de las bifidobacterias.

## **HAY QUE REALIZAR MÁS INVESTIGACIONES PARA OBTENER EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LAS PROPIEDADES DE LOS PREBIÓTICOS**

La investigación existente hasta el momento sobre prebióticos es extensa y variada y ha puesto de manifiesto que para asignar y demostrar las alegaciones de salud a un prebiótico han de tenerse en cuenta un gran número de factores. Por ello, todavía queda un importante trabajo multidisciplinar por realizar orientado a profundizar en los aspectos siguientes: i) mejora de los métodos de análisis y de detección para caracterizar correctamente los carbohidratos prebióticos facilitando, de esta forma, la asignación de propiedades bioactivas y el posible diseño de prebióticos de segunda generación con beneficios concretos para la salud; ii) definición de biomarcadores para seleccionar los grupos microbianos beneficiosos para la salud en función de la ruta de fermentación del prebiótico; iii) ensayos de intervención en humanos bien diseñados, robustos y de buena calidad que permitan valorar el efecto del consumo de los prebióticos en la selectividad microbiana, incluyendo para ello un mayor número de grupos bacterianos; iv) establecimiento de la ingesta diaria del prebiótico para desarrollar la actividad o las actividades atribuidas al mismo, así como la monitorización de los posibles efectos beneficiosos y secundarios a largo plazo del prebiótico ingerido y v) estudio de nuevas aplicaciones de los prebióticos en la prevención y el tratamiento de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2, las alteraciones inmunitarias o las alergias, entre otras.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Gibson GR., Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125:1401-1412.
- 2.- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall RA, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotics effects: metabolic and health benefits. *Brit J Nutr* 2010; 104 (2): S1-S63.

- 3.- FAO Technical Meeting on prebiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food Quality and Standards Service (AGNS). September 15-16, 2007.
- 4.- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP). 6<sup>th</sup> Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario. 2008.
- 5.- World Gastroenterology Organisation (WGO) (2011). En: Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos (<http://www.worldgastroenterology.org>). 2011.
- 6.- Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr Polym* 2007; 68: 587-597.
- 7.- Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 2012; 92: 2020-2028.
- 8.- Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G, Macfarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickman R, Lenoir-Wijnkoop I, Wlaker C, Buddington R. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull* 2010; 7 (1): 1-19.
- 9.- Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010; 1: 305-339.
- 10.- Miller JN, Whistler RL. Carbohydrates. En: *Food Chemistry* (ed. O.R. Fennema) New York: Marcel Dekker 2000, pp. 207.
- 11.- Bode L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides *J Nutr* 2006; 136 (8): 2127-30.
- 12.- Venema K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 2012; 22: 123-140.
- 13.- Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24: 214-219.
- 14.- Sanz ML, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Martínez-Castro I. Analysis of prebiotic oligosaccharides. En: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, Ch 13, pp. 465-534.
- 15.- Clemente A. In vivo assessment of the bioactivity of food oligosaccharides. En: *Food oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. (eds F. Javier Moreno & M. Luz Sanz., Wiley- Blackwell, Chichester, England, 2014, Ch 14, pp. 238-252.
- 16.- Cencič A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their application in Food microbiology – A review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: S4-S14.

- 17.- Van den Abbeele P, Roos S, Eeckhaut V, MacKenzie DA, Derde M, Verstraete W, Marzorati M, Possemiers S, Vanhoecke B, van Immerseel F, van de Wiele T. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microb Biotechnol* 2012; 5: 106-115.
- 18.- Yu J, Peng S, Luo D, March JC. *In vitro* 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109: 2173-2178.
- 19.- Parnell JA, Reimer RA. Prebiotics fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR: LA –cp rats. *Br J Nutr* 2012; 107 (4): 601-613.
- 20.- Guarner F, Azpiroz F. La evaluación científica de los alimentos funcionales. En: Juarez M, Olano A, Morais F, eds. Alimentos Funcionales. Madrid: FECYT, 2005: 11-22.
- 21.- Azpiroz F. From sensation to perception: the gut brain connection. En: Pasricha J, Willis WD, Gebhart GF. Chronic Abdominal and Visceral Pain. Theory and Practice. Boca Raton FL: CRC Press, 2007: 193-203.
- 22.- Caselato de Sousa VM, Freitas dos Santos E, Sgarbieri VC The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food Nutr Sci* 2011; 2: 133-144.
- 23.- Sangwan V, Tomar SK, Singh RRB, Singh AK, Ali, B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *J Food Sci* 2011; 76 (4): R103-R111.
- 24.- Maning TS, Gibson, GR. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18 (2): 287-298.
- 25.- Kajihara M, Kato S, Konishi M, Yamagishi Y, Horie Y, Ishii H. Xylooligosaccharide decreases blood ammonia levels in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(9):2514.
- 26.- Szilagy A. Functional Disaccharides: Lactulose, Lactitol, and Lactose. En: *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients. Health benefits and food applications* (eds S.S. Cho & E.T. Finocchiaro) CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton New York , 2010 Ch 5, pp. 95-122.
- 27.- Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J* 1999; 9: 69-80.
- 28.- Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol*. 1996; 7: 353-61.
- 29.- Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830S–837S.